Münster i/W. 1934. No 29 Phil. Diss.

Botanik

Zur Physiologie der Nebenzellen des Spaltöffnungsapparates.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde der Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster in Westfalen,

vorgelegt von

August Kelle
aus Bad-Oeynhausen

Münster 1934

Gedruckt in der Verlags-Anstalt Heinr. & J. Lechte, Emsdetten (Westf.)

Botanik

Zur Physiologie der Nebenzellen des Spaltöffnungsapparates.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde der Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster in Westfalen,

vorgelegt von

August Kelle
aus Bad-Oeynhausen

Münster 1934

Gedruckt in der Verlags-Anstalt Heinr. & J. Lechte, Emsdetten (Westf.)

Dekan: Prof. Dr. Eitel
Referent: Prof. Dr. Benecke
Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1933

Literatur.

Arends, J., Planta 1926, Bd. 1, S. 84.
Beck, W. A., Protoplasma 1927, Bd. 1, S. 15.
Benecke, W., Bot. Ztg. 1892, Bd. 50, S. 520.
Blagowestschenski, A. W., Jb. f. wiss. Bot. 1928, Bd. 69, S. 191.
Czapek, F., Sitzber. Wiener Akad. 1897, CVI 1, S. 14.
Darwin, F., Phil. Transakt. Soc. London, Ser. B., 1898, V. 190, p. 531.
Fitting, H., Jb. f. wiss. Bot. 1917, Bd. 57, S. 553.
Haberlandt, G., Beitr. z. allg. Bot. 1918, Bd. 1, S. 501.
Haberlandt, G., Sitzber. Preuß. Akad., Phys.-Math. Klass. 1924, S. 324.
Hagen, F., Beitr. z. allg. Bot. 1918, Bd. 1, S. 261.
Höfler, K., Planta 1926, Bd. 2, S. 454.
Hoffmeister, C., Jb. f. wiss. Bot. 1898, Bd. 31, S. 688.
Iljin, W. S., Beih. z. Bot. Cbl. 1915, Bd. 32, I. Abt., S. 15
Iljin, W. S., Jb. f. wiss. Bot. 1933, Bd. 77, S. 220.
Kasselmann, J., Beiträge zur Histochemie von Zellmembranen. Dissertation Münster 1933.
Kisselew, N., Journ. Soc. Bot. de Russie 1924, S. 187.
Knudson, L. and Ginsburg, S., Amer. Journ. of. Bot. 1921, V. 8, p. 164.
Kohl, F., Bot. Beibl. z. Leopoldina 1895, S. 1.
Leitgeb, H., Mitt. Bot. Inst. Graz 1886, Bd. 1, S. 123.
Linsbauer, K., Flora 1917, Bd. 109, S. 100.
Lloyd, F. E., Carn. Inst. Washington 1908, Publ. No. 82.
Märkert, M., Bot. Arch. 1931, Bd. 33, S. 501.
v. Mohl, H., Bot. Ztg. 1856, S. 697.
Müller, N. I. C., Jb. f. wiss. Bot. 1872, Bd. 8, S. 75.
Oppenheimer, H. R., Planta 1932, Bd. 16, S. 467.
Overbeck, F., Planta 1930, Bd. 10, S. 138.
Pringsheim, E. G., Jb. f. wiss. Bot. 1931, Bd. 74, S. 749.
Renner, O., Biol. Zbl. 1912, Bd. 32, S. 486.
Richter, A. A. u. Dworetzkaja, E. T., Journ. exper. Landwirtschaft im Südosten d. Europ. Rußlands 1927, Bd. 3, S. 51.
Rosing, M., Ber. d. dtsch. Bot. Ges. 1908, Bd. 26, S. 438.
Sayre J. D., Ohio Journ. of Science 1926 V. 26, p. 233.
Scarth, G. W., Protoplasma 1927, Bd. 2, S. 498.
Schäfer, R., Ueber den Einfluß des Turgors der Epidermiszellen auf die Funktion des Spaltöffnungsapparates. Diss. Berlin 1887.
Schellenberg, G., Bot. Ztg. 1896, Bd. 54, S. 178.
Schorn, M., Jb. f. wiss. Bot. 1929, Bd. 71, S. 783.
Schwarz, F., Ber. d. dtsch. Bot. Ges. 1924, Bd. 42, S. 21 u. 28.
Schwendener, S., Monatsber. Berl. Akad. d. Wiss. 1881, S. 883.
Senft, E., Sitzber. Wiener Akad. 113, Abt. 1, 1904.
Stalfelt, M. G., Planta 1928, Bd. 6, S. 183.
Steinberger, A. L., Zur Physiologie und Oekologie der Luft- und Wasserspalten. Diss. Jena 1920.
Steinberger, A. L., Biol. Zbl. 1922, Bd. 42, S. 405.
Strugger, S. u. Weber, Fr., Ber. d. dtsch. Bot. Ges. 1926, Bd. 44 S. 272.
Ursprung, A. u. Blum, G., Ber. d. dtsch. Bot. Ges. 1916, Bd. 34, S. 88.
Ursprung, A. u. Blum, G., Jb. f. wiss. Bot. 1924, Bd. 63, S. 1.
Vassiljev, J. M., Planta 1931, Bd. 14, S. 225.
Weber, Fr., Jb. f. wiss. Bot. 1925, Bd. 64, S. 687.
Wiggans, R. G., Amer. Journ. of Bot. 1921, V. 8, p. 30.
Ziegenspeck, H., Bot. Archiv 1928, Bd. 21, S. 449.

Die Arbeit von J. Pekarek, **Planta 1933, Bd. 21, S. 419, konnte nicht mehr berücksichtigt werden.**

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547224_0125

Die anatomische Ausbildung und der spezifische Entwicklungsverlauf stellt die Nebenzellen[1]) des Spaltöffnungsapparates in engere Beziehungen zu den Schließzellen. Die Frage, ob die Nebenzellen auch physiologisch dem Spaltöffnungsapparat zuzurechnen seien, ist bis in die neuere Zeit in voneinander abweichender Richtung beantwortet worden; und zwar sind alle drei Möglichkeiten behauptet worden: 1. daß die Nebenzellen sich beim Spiel der Stomata passiv verhalten, 2. daß sie allein die Bewegung bewirken, 3. daß Schließ- und Nebenzellen an diesem Vorgang beteiligt seien.

Während v. Mohl (1856) den Nachbarzellen eine Beteiligung am Bewegungsvorgang zuschreibt, sind nach Meinung von Müller (1872) und Leitgeb (1886) die Nebenzellen und zwar ausschließlich hierfür verantwortlich. Demgegenüber konnte Schwendener (1881) nachweisen, daß die Schließzellen allein Ursache der Spaltenbewegung sind. Ihm folgte sein Schüler Schäfer (1887). Darüber hinaus schrieb Benecke (1892) den Nebenzellen eine mittelbare Funktion, nämlich den Schutz der Schließzellen gegen zu starke Deformierung bei Schrumpfung, zu.

Da *v. Mohl* und namentlich *Schwendener* durch exakte Messungen feststellten, daß die Oeffnungs- und Schließbewegung ihre Ursachen in Formveränderungen der Schließzellen hat, und man als Ursache hierfür allgemein die Schwankungen der osmotischen Zustandsgrößen annimmt, bietet sich zur Entscheidung der Frage, ob und wieweit die Nebenzellen in den Bewegungsvorgang eingreifen, der Weg, die osmotischen Zustandsgrößen der Nebenzellen während der stomatären Oeffnungs- und Schließbewegung zu messen, einmal direkt, auf plasmolytischem Wege, zum andern indirekt durch Erfassung der osmotisch wirksamen bzw. unwirksamen Substanzen.

Den ersten Weg wählten Kohl (1895) und Schellenberg (1896). Kohl fand bei der Bestimmung der „Turgorgröße"[2]) am häufigsten die Relation Schließzellen < Nebenzellen < Epidermis-

[1]) Unberücksichtigt bleibt bei diesen Untersuchungen der von Haberlandt (1924) beschriebene „unvollkommene Typus der Nebenzellen". Hierbei treten die Nebenzellen nur bei einem Teil der Spalten auf, sind an Zahl und Form variabel und gleichen mehr oder weniger den übrigen Epidermiszellen.

[2]) Unter Turgorgröße versteht Kohl den osmotischen Wert bei Grenzplasmolyse.

zellen, seltener Schließzellen > Nebenzellen > Epidermiszellen. Daraus schloß er, daß überall da, wo die Spalten im Entspannungszustand mehr oder weniger offen sind, die Epidermis- oder die Nebenzellen den Schluß selbsttätig bewirken. Ein völlig passives Verhalten schrieb Schellenberg den Nebenzellen zu, wenn er fand, „daß die Oeffnungsbewegung der Schließzellen durch Zunahme des osmotischen Druckes in diesen zustande kommt und nicht durch Abnahme des Druckes in den Nebenzellen; der Spaltenschluß durch Abnahme des osmotischen Druckes in den Schließzellen und nicht durch Zunahme in den Nebenzellen erfolgt." Eine vermittelnde Stellung nimmt F. Darwin (1898) ein, wenn er findet, daß im wesentlichen die Bewegungen der Stomata von den Schließzellen bewirkt werden. Doch gibt es nach seiner Meinung auch Fälle, in welchen die Nebenzellen bezw. die Epidermiszellen aktiv eingreifen. Nach den von Steinberger (1920, 1922) angegebenen Plasmolysewerten verhalten sich die Nebenzellen durchaus passiv. Gleichfalls vermutet Kisselew (1924) aus der Geringfügigkeit der Schwankungen des „osmotischen Druckes" in den Nebenzellen (4 %) im Vergleich zu den deutlicheren der Schließzellen (22 %) ein autonomes Verhalten der letzteren.

Durch Vergleich der osmotischen Substanzen innerhalb der Schließ- und Nebenzellen konnte früher M. Rosing (1908) zu keinem eindeutigen Resultat gelangen. Während Hagen (1916), der gleichfalls die Inhaltsstoffe des Spaltöffnungsapparates untersuchte und in den Nebenzellen einiger winterharter Blätter oft mehr osmotisch aktive Substanz fand als in den Schließzellen, eine Mitbeteiligung der Nebenzellen beim Schließen annahm.

Diese chronologische Uebersicht über die ältere Literatur läßt erkennen, daß, obwohl vereinzelt, aber immer wieder eine Mitwirkung der Nebenzellen vermutet wurde, doch die Mehrzahl der Untersucher die gegenteilige Ansicht von der völligen Funktionslosigkeit der Nebenzellen für den Bewegungsvorgang vertrat.

Die sich aus der morphologischen Eigenart der Nebenzellen ergebende Unwahrscheinlichkeit dieser Ansicht führte zu neuen Versuchen, die Beziehungen beider Elemente zu klären. So kommen *Strugger* und *Weber* (1926) nach Schätzungen des Stärkegehaltes der Schließ-, Neben- und Epidermiszellen von Galium mollugo zu folgender Annahme: „1. Wird in den Schließzellen die Stärke abgebaut (im Licht), so wird in den Nebenzellen die Stärke aufgebaut. 2. Wird in den Schließzellen die Stärke aufgebaut (im Dunkeln), so wird in den Nebenzellen die Stärke abgebaut. — Die Epidermiszellen verhalten sich in bezug auf den Stärkeab- und -aufbau gleichsinnig." Den gleichen Antagonismus glauben sie aus den plasmolytischen Messungen zu entnehmen.

Durch diese Untersuchungen angeregt, führten *Richter* und *Dworetzkaja* (1926) entsprechende Experimente an Galium Aparine, Galium rubioides und Aspe-

rula odorata durch. Zusammenfassend finden sie, daß „die exakte Kenntnis der Dynamik der chemischen und osmotischen Prozesse im epidermalen Apparate der Versuchspflanzen keine Gründe gibt, den Nebenzellen und überhaupt den Epidermalzellen eine etwaige Rolle beim Spiele der Stomata zuzuschreiben. Entgegen den Aeußerungen *Struggers* und *Webers* bleibt der Schließzellenapparat, mit schön ausgebildeten Nebenzellen ausgerüstet, trotzdem funktionell abgesondert und mechanisch selbständig in seiner Arbeit." Siehe auch das Sammelreferat von Scarth (1927).

Nachdem durch *Richter* und *Dworetzkaja* die von *Strugger* und *Weber* gegebene Lösung unseres Problems wieder in Frage gestellt worden war, erschien eine eingehende und darum auf wenig Objekte beschränkte Untersuchung erforderlich.

Eigene Untersuchungen.

Meine Untersuchungen wurden an Phuopsis stylosa, einer stellaten Rubiacee, und an Tradescantia pendula ausgeführt. In wenigen Fällen wurde zu Vergleichszwecken Galium mollugo, das ebenso wie die beiden anderen Objekte hypostomatische Blätter besitzt, verwendet.

I. Spaltöffnungsweite und Stärkegehalt der Schließ-, Neben- und Epidermiszellen.

Messung der Spaltweite.

Für die mikroskopische Feststellung der Stomataweite bieten sich drei Wege: a) Messung an Schnitten in Paraffinöl, b) Messung nach Fixierung mit absolutem Alkohol, c) Bestimmung der Spaltenweite durch Oberflächenbeleuchtung (Vgl. hierzu *M. Schorn*, 1929). Die letzte Methode schied von vornherein aus, da eine scharfe Erfassung der Spaltenweite nicht möglich war. Die von *Stalfelt* (1928) angewandte Messung an Schnitten in Paraffinöl liefert nach seinen Angaben für Vicia Faba hinreichend sichere Werte. Jedoch finde ich für Phuopsis, daß die in Oeffnungsbewegung befindlichen Stomata, sowohl am ganzen Blatt wie an Flächenschnitten sich nach dem Einlegen in Paraffinöl oft anomal weit öffnen. In diesen Fällen führte nachfolgende Plasmolyse

— wahrscheinlich infolge Ueberdehnung der Membranen — zu keinem Spaltenschluß. Die Brauchbarkeit der *Stalfeltschen* Methode beschränkt sich für Phuopsis auf in Schließbewegung befindliche Schließzellen, da für sie keine, durch die Methode bedingte Veränderung wahrzunehmen war.

Die Brauchbarkeit der Fixierungsmethode mit Alkohol prüfte ich sowohl an sich öffnenden, als auch an sich schließenden Spalten (Tabelle 1); zu diesem Zwecke wurde die Spaltenweite auf dreierlei Weise bestimmt. Zunächst wurde genau nach den *Lloydschen* Angaben (1908) verfahren, d. h. die Epidermis des Blattes wurde abgezogen und sofort in absoluten Alkohol überführt, weiterhin wurde die Epidermis an fixiertem Material abgezogen und dann die Stomataweite bestimmt, schließlich wurden Messungen an fixierten, unbeschädigten Blättern vorgenommen.

Tabelle 1

Spaltweiten nach Fixierung mit abs. Alkohol.

in Oeffnungsbewegung 6. VI. 1932 11h			in Schließbewegung 6. VI. 1932 16h		
erst abgezogen, dann fixiert	erst fixiert, dann abgezogen	gz. Blatt fixiert und am gz. Blatt gemessen	erst abgezogen, dann fixiert	erst fixiert, dann abgezogen	gz. Blatt fixiert, und am gz. Blatt gemessen
3,5	0,8	0,2	2,0	1,4	1,0
2,5	1,0	0,2	1,0	1,2	0,6
2,6	0,6	0,8	1,0	1,0	0,6
2,6	0,2	0,4	2,2	0,8	0,8
2,8	1,0	0,8	0,8	0,6	0,6
2,8	0,1	0,6	0,4	1,0	0,8
1,4	1,0	0,8	1,6	1,4	0,4
1,8	1,0	0,2	1,4	0,8	0,2
3,4	0,8	0,2	0,8	1,0	0,8
3,0	0,6	0,2	1,0	0,8	1,2
3,0	1,2	1,0	1,0	0,6	0,4
2,0	0,2	0,6	0,2	0,4	1,0
1,8	0,1	1,0	0,6	0,8	0,8
3,2	0,8	0,8	1,4	1,2	0,2
2,4	0,8	0,2	1,0	1,0	1,2
2,0	0,4	0,2	1,0	0,4	0,8
2,0	0,6	0,4	1,0	0,8	0,4
2,6	0,2	0,6	1,0	0,8	0,2
3,0	0,2	0,8	1,4	1,2	0,6
2,3	0,8	0,2	0,8	0,4	0,8
2,53	0,65	0,51	1,08	0,87	0,67

Durchschnittswerte aus je 20 Messungen lassen erkennen, daß die nach *Lloyd* behandelten Schließzellen, namentlich wenn sie sich im Oeffnen befinden, gegenüber den erst fixier-

ten, als auch gegenüber denen ganzer fixierter Blätter eine erheblich größere Stomataweite aufweisen. Ursache dieser Unterschiede kann sowohl das Ablösen der Epidermis sein, als auch eine direkte Wirkung des Alkohols.

Um den Einfluß, den das Trennen der Oberhaut aus dem Blattverband hervorruft, festzustellen, wurden an nicht fixiertem, in Wasser liegendem Material die gleichen Spalten zuerst am ganzen Blatt und dann am Epidermisabzug gemessen. Zur Erleichterung der Messung wurden die Objekte vorher in Wasser evakuiert. Wie die Versuche zeigten, verursacht das Abziehen von Epidermisstreifen eine starke, in den Einzelfällen ungleiche Veränderung der Spaltenapertur, und zwar können sich die Stomata dabei verengen oder erweitern. Als Ursache dieser Unterschiede sieht *v. Mohl,* der die gleiche Erscheinung beobachtete, die durch die Operation des Ablösens hervorgerufene Zerrung der Gewebestreifen an. Daß dieses die alleinige Ursache sein soll, ist unwahrscheinlich, umsomehr, da die Zerrung, die parallel zur Längsachse der Spalten erfolgt, eher eine Verengung des Spaltenlumens bei gleichzeitiger Verlängerung der Schließzellen erwarten ließe, während tatsächlich die Größenzunahme nach Art der normalen Spaltenerweiterung erfolgt. Viel näher liegt es, die Störung des Spannungsgleichgewichtes Mesophyll-Epidermis verantwortlich zu machen. *Vassiljev* (1931) glaubte eine Veränderung des Oeffnungszustandes durch Beschleunigung der Manipulation (1—2 Sek.) ausschließen zu können.

Tabelle 2

Stomataweite in Wasser	Stomataweite in Alkohol absolutus nach									
	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'
2,2	2,2	2,2	2,2	2,0	3,0	3,0	1,8	1,8	1,8	1,8
1,1	1,1	1,1	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
3,2	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	4,5	4,5	4,5	4,5	5,5
2,0	2,5	2,0	2,5	3,0	0,6	0,6	9,6	0,6	0,6	0,6

Um die Wirkung des Alkohols auf die Aenderung der natürlichen Stomataweite zu prüfen, wurde zunächst ein gan-

zes Blatt in Wasser evakuiert, daran eine bestimmte Spaltöffnungsweite, die durch Tuschemarken gezeichnet war, gemessen und nach Absaugen des Wassers und nach Zusatz von absolutem Alkohol die Messung wiederholt. Die Meßergebnisse in Tabelle 2 lassen erkennen, daß auch der Alkohol an sich eine Veränderung der stomatären Weite hervorrufen kann. Diese Veränderung ist sowohl in ihrem Ausmaß als auch nach dem Zeitpunkt ihres Eintrittes ungleich. In den meisten Fällen erfolgt der Eintritt nicht sogleich, sondern nach jeweils verschiedener Zeit. Nach ca. 10 Minuten bleibt das Lumen konstant.

Führe ich das Gleiche nicht am ganzen Blatt, sondern an Epidermisabzügen aus, so bleibt die augenblickliche Weite im fixierten Zustande erhalten.

Aus den letzten beiden Versuchsanordnungen ergibt sich, daß die Veränderung der Stomataweite an ganzen Blättern nicht eine direkte Wirkung des Alkohols sein kann. Vielmehr sind die Veränderungen irgendwelchen durch den Alkohol ausgelösten Vorgängen im Blattgewebe zuzuschreiben. So wird auch das ungleiche Verhalten der Stomata dem Verständnis näher gebracht. Beginn, Ausmaß und Art der Veränderung scheinen davon abhängig zu sein, wann, wo und wie der Alkohol in die die Stomata begrenzenden Zellkomplexe eindringt.

Zusammenfassend ergibt sich, daß 1. durch das Abziehen der Epidermis bereits das Spannungsgleichgewicht Epidermis-Mesophyll gestört wird und dadurch die stomatäre Oeffnungsweite sich ändert, 2. nachfolgende Ueberführung dieser Epidermisabzüge in Alkohol keine weitere Veränderung der Spalten hervorruft und 3. bei der Fixierung ganzer Blätter die Spaltenapertur indirekt beeinflußt wird.

Wandle ich jetzt die *Lloydsche* Methode derart ab, daß einmal das Spannungsgleichgewicht zwischen Epidermis und Mesophyll nicht oder kaum gestört wird und zum andern die indirekte Wirkung des Alkohols ausgeschlossen wird, so muß die Gewinnung zutreffender Werte möglich sein. Zu diesem Zwecke wurden Flächenschnitte hergestellt, die höchstens 2—3 Lagen Mesophyll besaßen, sie wurden in Alkohol überführt und dann die Spaltweite gemessen. Tabelle 3 ermöglicht die Zuverlässigkeit dieser Methode zu prüfen. Spalte 1

Tabelle 3

Stomataweite gemessen in

H_2O am gez. Blatt	H_2O am Flächenschnitt, (2—3 Lagen Mesophyll)	Alkohol am gleichen Flächenschnitt
0,8	0,7	0,7
0,8	0,8	0,8
1,6	1,6	1,5
1,7	1,7	1,7
1,6	1,6	1,6
1,2	1,0	1,0
1,2	1,2	1,2
1,2	1,1	1,1
0,8	0,7	0,7
0,8	0,8	0,8
1,1	1,0	1,0
0,8	0,8	0,8
0,9	0,9	0,9
0,9	0,9	0,9
1,0	1,0	0,9
0,9	0,9	0,9
0,9	0,9	0,9
0,9	1,0	1,0
1,3	1,2	1,2
1,0	0,9	0,9
1,07	1,035	1,025

gibt die Werte wieder, die am ganzen Blatt in Wasser gewonnen wurden, Spalte 2 die der Flächenschnitte, die Werte der Spalte 3 sind nach der Fixierung erhalten. Hieraus ergibt sich eine mittlere Veränderung der Spalten um nur 1/25 gegenüber den natürlichen Weiten. Da Veränderungen dieser Größenordnung unberücksichtigt bleiben können, wurden die Stomatamessungen nach dieser Methode durchgeführt.

Der tägliche Verlauf der Spaltöffnungsweite wurde an den Blättern ein und desselben Quirles gemessen und die typischen Weiten mit dem Abbéschen Zeichenapparat gezeichnet.[3]) Die Blätter eines Quirles sind vergleichbar, zeigte es sich doch, daß die Stomataweiten — durchschnittlich 20 Messungen pro Blatt — sowohl an den Haupt- als auch an den Nebenblättern wenig voneinander abweichen. Siehe **Tab. 4.**

Feststellung des Stärkegehaltes.

In den Zellen desselben Spaltöffnungsapparates, deren Weite gemessen worden war, wurde die Stärke mittels

[3]) Um den normalen Regulationsprozeß zu erfassen, wurde absichtlich jeder künstliche Eingriff, sei es durch Belichtung oder Verdunkelung, vermieden.

Chloraljod (Siehe *Gilg-Brandt-Schürhoff,* Pharmakognosie, Bln. 1927, S. 469) sichtbar gemacht, so daß die Stärkekörner in das mit dem Zeichenapparat festgehaltene Bild eingetragen werden konnten.

Tabelle 4

Mittlere Spaltöffnungsweite der Schließzellen an Haupt- und Nebenblättern von Phuopsis styl.

Quirl	Hauptblatt 1	Hauptblatt 2	Nebenblatt 1	Nebenblatt 2	Nebenblatt 3	Nebenblatt 4
I.	1,1	1,08	1,1	1,25	1,1	1,1
II.	0,94	0,87	0,87	0,83	0,87	0,75

Befund.

Um den Verlauf des Stärkeauf- und -abbaues in den Schließzellen, Nebenzellen und Epidermiszellen von Phuopsis stylosa im Laufe des Tages zu veranschaulichen, seien aus den Protokollen einige typische herausgegriffen. Ein Vergleich der Spaltöffnungsweite und des Stärkegehaltes der Schließzellen (Abb. 1) zeigt entsprechend den Beobachtungen *Lloyds, Rosings, Iljins* (1915), *Steinbergers, Struggers* und *Webers, Richters* und *Dworetzkajas* und anderen im allgemeinen eine Stärkeabnahme beim Oeffnen und eine Zunahme beim Schließen. Auffallend geringe Schwankungen im Stärkegehalt weisen bei gleicher Stomataweite gegenüber Freilandpflanzen im Gewächshaus überwinternde Pflanzen auf. Nicht selten weichen die Schließzellen von diesem normalen Gang ab, so kann es vorkommen, daß Schließzellen ungleich weit geöffneter Stomata gleiche Stärkemengen besitzen, diese Unterschiede können am selben Blatt gleichzeitig auftreten, es kann aber auch der Stärkegehalt der Schließzellen abendlich geschlossener bis fast geschlossener Spalten genau so groß sein, wie der mittags geöffneter. Diese Fälle beweisen, daß der normale Antagonismus nicht unabänderlich ist. Vielfach wird in der Literatur hierfür ein verschiedenes Alter und eine verschiedene Lage im Blatt verantwortlich gemacht. Nun ist aber von vornherein damit zu rechnen, daß die Beziehungen zwischen Stärkegehalt

und Oeffnungsbewegung nur indirekt sind. Der Oeffnungszustand der Schließzellen ist durch ihren Turgeszenzgrad bestimmt, der wiederum in Abhängigkeit zur Zellsaftkonzentration steht, für welche ihrerseits nicht die Stärkemenge, sondern der Gehalt an osmotisch wirksamer Substanz einerseits und der von der allgemeinen Hydratur der Pflanze abhängige

Abbildung 1

Stomataweite und Stärkegehalt der Schließ-, Neben- und Epidermiszellen von Phuopsis styl. 13. X. 1931

Wassergehalt der Zelle andererseits bestimmend ist. Eine direkte Beziehung zwischen Stärkegehalt und Oeffnungsgrad wäre nur bei der Annahme zu erwarten, daß 1. der in der Zelle vorhandene Zucker die Hauptmenge der osmotisch wirksamen Substanz ausmacht, und daß 2. die Menge der Gesamtassimilate stets gleich bleibt. Aber schon die Gegenwart von Chloroplasten in den Schließzellen scheint dem zu widersprechen: Beginnen die Chloroplasten der Schließzellen zu assimilieren, ohne daß eine Ableitung entsprechender Mengen erfolgt, so ist eine Veränderung des osmotischen Verhaltens bei Konstanz des Stärkegehaltes möglich, denn in erster Linie dienen jetzt zunächst die neugebildeten Assimilate der Vermehrung der osmotisch wirksamen Substanzen, weniger die Mobilisierung

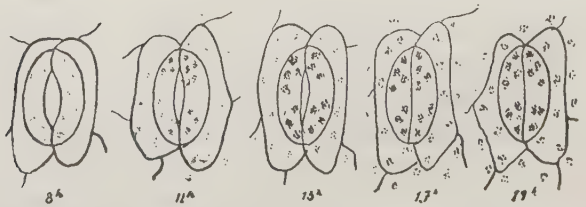
der Reservestärke. Wir hätten also in diesem Falle im mikroskopischen Bild trotz weit geöffneter Spalten große Stärkemengen.

Die Nebenzellen, die ebenso wie die Epidermiszellen morgens früh durchweg frei von Stärke sind, lassen am Spätnachmittag ihre größte Stärkemenge erkennen. Bis zur maximalen täglichen Spaltweite, die in unserm Beispiel um 11 Uhr erreicht ist, verhalten sich die Nebenzellen bezüglich der Stärke den Schließzellen gegenüber antagonistisch im Sinne *Struggers* und *Webers* bzw. *Richters* und *Dworetzkajas*. Dieses gegensätzliche Verhalten beider Zelltypen wird mit darauffolgender Schließbewegung gestört, mit Zunahme der Zahl und Größe der Stärkekörner in den Schließzellen erfolgt keine Abnahme der Stärke in den Nebenzellen, vielmehr nimmt sie bis zum Spätnachmittag noch zu oder bleibt in selteneren Fällen unverändert. Ist vollkommener Spaltenschluß erreicht, so weisen Schließ- und Nebenzellen ihre größte tägliche Stärkemenge auf. Die von *Strugger* und *Weber* für Galium mollugo, von *Richter* und *Dworetzkaja* für Galium Aparine und Asperula odorata behaupteten Beziehungen existieren für Phuopsis stylosa nicht.

Dieser Schluß erfährt noch durch das Ergebnis des in Abb. 2 mitgeteilten Versuches eine besondere Stütze. In diesem trat die maximale tägliche Stomataweite schon gegen acht Uhr auf.

Abbildung 2

Spaltöffnungsweite und Stärkegehalt der Schließ-, Neben- und Epidermiszellen von Phuopsis stylosa. 25. IV. 1933.



Um diese Zeit wiesen die Schließzellen die geringste im ganzen Versuchsverlauf beobachtete Stärkemenge auf. Die Nebenzellen waren dagegen vollkommen stärkefrei. Mit dar-

auffolgender Schließbewegung erfolgt in den Nebenzellen eine Zunahme der Stärkebildung, deren Maximum gegen 17 Uhr erreicht ist. Das Auftreten der Stärke in den Nebenzellen erfolgt also ganz unabhängig von dem Spiel der Stomata und erscheint vielmehr durch den Assimilationsverlauf bedingt. Auch das nicht seltene Vorkommen von gleicher Stärkemenge in den Nebenzellen geschlossener und geöffneter Stomata, wie das Auftreten ungleicher Stärkemengen in den Nebenzellen des gleichen Paares scheinen einem Antagonismus zu widersprechen.

Die übrigen Oberhautzellen verhalten sich in ihrem Stärkeauf- und -abbau wie die Nebenzellen, nur mit der Abweichung, daß die Stärkebildung in den Nebenzellen zeitlich gewöhnlich früher auftritt.

Die Beobachtung, daß das Auftreten der Stärke in den Nebenzellen im Tagesverlauf unabhängig von den Bewegungsvorgängen der Schließzellen erfolgen kann, wurde experimentell ergänzt:

Um festzustellen, ob bei unterbundener Assimilationstätigkeit Beziehungen zwischen Stärkegehalt von Schließ- und Nebenzellen zur Spaltöffnungsweite bestehen, wurden von eingetopften Pflanzen oder in Kölbchen mit Leitungswasser eingesetzten beblätterten Sprossen, die einen unter eine Glasglocke, die mittels KOH-Lösung CO_2 frei gemacht worden war, und die Vergleichsobjekte unter eine gleich große Glocke mit gewöhnlicher Luft gebracht. Zur Erzielung gleicher Wasserdampftension enthielt die eine Glocke eine Schale mit 35 % Kalilauge und die andere eine Schale mit konzentrierter NaCl-Lösung. Der Stopfen des Kölbchens, sowie der Blumentopf, wurden mittels Wachsüberzug luftdicht verschlossen; Hahnfett dichtete die Glocken.

Daß die Methode an sich keinen schädlichen Einfluß auf die Pflanzen ausübt, geht aus dem gleichen Verhalten von Freilandpflanzen und denen in CO_2-haltiger Luft hervor. In CO_2-freiem Raum öffnen sich, entsprechend den Befunden *Linsbauers* (1917) die Spalten, dem normalen Tagesverlauf entsprechend; Schließbewegung trat in der Beobachtungszeit (48 Std.) nicht ein, auch nicht bei künstlicher Verdunkelung. Schließung und Geschlossenbleiben der Schließzellen im CO_2-freien Raum, wie es *Schellenberg* und *Hagen* festzustellen glaubten, wurde niemals beobachtet.

Bei Versuchsbeginn waren die Spalten stets geschlossen, die Schließzellen zeigten große, die Neben- und Epidermiszellen geringere Stärkemengen. Bei CO_2-Entziehung verschwindet

die Stärke in allen drei Zelltypen, frühestens nach acht Stunden. In diesen Versuchen war die in normaler Weise erfolgende Oeffnungsbewegung von einer Abnahme der Stärke in den Schließzellen begleitet. Soweit entspricht dieses Verhalten den Angaben *Struggers* und *Webers*. Dagegen trifft die weitere Behauptung der gleichen Autoren, daß während der Schließbewegung der Stärkegehalt der Nebenzellen steigt, für unser Objekt unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht zu. Die Stärkemenge bleibt nicht konstant, sondern verschwindet.[4]) Es geht also auch aus diesen Versuchen hervor, daß normale Oeffnungbewegung ohne Anstieg oder Bildung von Stärke in den Nebenzellen möglich ist.

Für die Frage nach der Funktion der Nebenzellen ist die Beobachtung ihres Stärkegehaltes nur insofern von Bedeutung, als sie Rückschlüsse auf die Zuckermengen, die osmotisch wirksamen Substanzen, erlaubt. Die oben mitgeteilten Versuchsergebnisse zeigen, daß ein solcher Schluß nicht möglich sein kann, deshalb ergibt sich die Notwendigkeit, die osmotisch wirksame Substanz, vor allem die Zuckermenge, zu bestimmen.

II. Spaltöffnungsweite und Zuckergehalt der Schließ-, Neben- und Epidermiszellen.

Soviel sei gleich von vornherein gesagt, daß bei keiner der üblichen Methoden, weder dem Reduktionsverfahren noch der Phenylhydrazinprobe, die zur Beobachtung kommenden Reaktionen spezifisch für Zucker sind, geschweige eine quantitative Analyse erlauben.

Die Methode des Zuckernachweises mittels *Fehlingscher* Lösung, die auf ihre Eignung hin für unsere Zwecke von *Rosing* an ganzen Blättern verschiedener Objekte geprüft wurde, erwies sich deshalb als untauglich, weil der durch die Hexosen bewirkte Niederschlag von Kupferoxydul nicht lokalisiert bleibt und auftretende Quantitätsunterschiede nicht mit Sicherheit festzustellen erlaubt. Auch *Hagen* ist es mit der

[4]) Aus der Beobachtung, daß Schließ-, Neben- und Epidermiszellen keine Stärke besitzen, kann mit einiger Sicherheit geschlossen werden, daß im CO_2-freien Raum die entstehende Atmungskohlensäure zur Anregung der Assimilationstätigkeit kaum genügt; dies erscheint auch deshalb verständlich, da bei der großen Steilheit des CO_2-Gefälles eine starke Diffusion der CO_2 aus dem Pflanzeninnern in den Außenraum anzunehmen ist.

gleichen Methode nur „in seltensten Fällen gelungen, den Zucker lokalisiert nachzuweisen." Es erweist sich also die Reaktion nach *Fehling,* innerhalb einzelner Zellen Zucker nachzuweisen, als unbrauchbar. Ebenso unbefriedigende Resultate lieferte die Methode zur Lokalisierung des Kupferoxyduls von *A. Meyer* (1885), die Behandlung mit dem *Lidforß-Hagenschen* Zuckerreagens sowie das von *Flückiger* (1885) beschriebene Verfahren mit festem Kupfertartrat.

Die Ursachen für diese einander widersprechenden und unsicheren Ergebnisse sind in den der Methode anhaftenden Fehlerquellen zu suchen. Sie bestehen neben dem Umstande, daß der Niederschlag nur selten in den Zellen lokalisiert erscheint, namentlich darin, daß die zur Beobachtung gelangenden Reaktionen nicht spezifisch für die bei der gegebenen Fragestellung allein wichtigen Zuckerarten sind, sondern durch sie alle in der Zelle reduzierbaren Substanzen, das heißt vor allem alle Stoffe mit freien Aldehydgruppen erfaßt werden. Hierdurch werden einmal reduzierbare Substanzen nicht-zuckerartiger Natur mit erfaßt, zum andern entzieht sich z. B. der Rohrzucker der Beobachtung.

Um dem letzten Uebelstande zu entgehen, haben *Czapek* (1897) und *Hoffmeister* (1898) ein Verfahren ausgearbeitet, das den Rohrzucker fermentativ invertiert und damit nachweisbar macht. Um den in den Schließ-, Neben- und Epidermiszellen etwa vorhandenen Rohrzucker mit zu erfassen, wurden entsprechend dem vorgenannten Verfahren die Präparate ca. 3 Stunden mit Hefeinvertin behandelt. Der Vergleich der Niederschlagsmengen vor und nach der Fermentierung ergab keine merkbaren Unterschiede. Nach diesem Ergebnis scheint sich eine Anwendung des *Czapek-Hoffmeister'schen* Verfahrens zum Zuckernachweis zu erübrigen.

Die eine der erwähnten Fehlerquellen, daß Stoffe, die keine Zucker sind, trotzdem die Reaktion ergeben, erlangt durch die bei diesem Verfahren übliche energische Vorbehandlung (Anwendung hoher Temperaturen, Zusatz von Säuren und Alkalien) hohe Bedeutung. So erscheint vor allem eine hydrolytische Spaltung von glukosidartigen Substanzen nicht ausgeschlossen, ein Umstand, der die Sicherheit jeglicher Ergebnisse stark beeinträchtigen muß.

Diesen Nachteil vermeidet die Phenylhydrazinprobe nach *Senft* (1904). Das Reagens kam in den verschiedensten Modifikationen zur Anwendung:

a) salzsaures Phenylhydrazin + essigsaures Natron, gelöst in 10% Glycerin.
b) „ „ + essigsaures Natron, gelöst in konz. Glycerin.
c) „ „ + Essigsäure.
d) Mit Natriumazetat gesättigte Essigsäure + 1 Tropfen Phenylhydrazin.

Vorversuche an Allium Cepa führten zu brauchbaren Resultaten. Bei Phuopsis stylosa jedoch versagte das Verfahren vollkommen.

Einwandfreie mikrochemische Methoden zum Nachweis von Zucker in einzelnen Zellen sind nicht bekannt. Aus diesem Grunde ist unsere Fragestellung, ob die Bestimmung der Stärkemenge einen sicheren Anhalt zur Feststellung der Menge osmotisch wirksamer Substanz (Zucker) und damit der Höhe der osmotischen Werte gibt, nicht zu entscheiden. Ebensowenig ist aus dem gleichen Grunde eine direkte Bestimmung der osmotischen Substanz möglich. Hinzu kommt eine weitere Schwierigkeit: Die Bestimmung des osmotischen Zustandes nach ihrem Gehalt an Zucker ist selbst dann, wenn dieser sicher zu ermitteln wäre, nur unter der Voraussetzung richtig, daß außer Zucker andere osmotische wirksame Substanzen (Salze, organische Säuren) nicht vorhanden sind. Dieser Voraussetzung fehlt jedoch jede empirische Grundlage.

Als einziger Weg zur Erfassung der osmotischen Zustandsgrößen bleibt vorläufig die Bestimmung des osmotischen Wertes.

III. Spaltöffnungsweite und osmotische Zustandsgrößen.

Für das Studium des osmotischen Wertes der Einzelzelle kam nur das plasmolytische Verfahren in Betracht, da die kryoskopische Untersuchung nur Durchschnittswerte ganzer Gewebekomplexe liefert.

Grenzen und Fehlerquellen der plasmolytischen Methode.

Für unsere Versuchsobjekte erwies sich Rohrzucker als geeignetes Plasmolytikum, da sich für diese Substanz der Protoplast, bzw. der Tonoplast als impermeabel, die Zellwand als leicht durchlässig erwies. (Vergleiche auch *Renner* (1912)

Ursprung und *Blum* (1916, 1924), *Fitting* (1917), *Höfler* (1926), *Beck* (1927), *Blagowestschenski* (1928), *Pringsheim* (1931) und andere.) Nach den Beobachtungen über Anatonose bzw. Katatonose an auf Rohrzuckerlösung schwimmenden Blättern ist die Möglichkeit einer Veränderung des osmotischen Wertes auch für unsere Objekte anzunehmen, zumal der Plasmolysevorgang langsam verläuft. Jedoch ließ ein Vergleich des Stärkegehaltes kurz vor dem Einlegen in das Plasmolytikum mit dem am Ende des Versuches (nach ca. 60 Minuten) niemals eine Regulation erkennen. Noch besser beweist das Unverändertbleiben des Plasmolysegrades — in den Schließzellen von Phuopsis stylosa bis zu 6 Stunden, — daß während der Beobachtungszeit keine Veränderung des osmotischen Zustandes eintritt. Weiterhin ergaben Messungen mit $CaCl_2$ als Plasmolytikum Werte, die den mit Rohrzucker ermittelten entsprachen.

Zur Bestimmung des osmotischen Wertes einer Zelle oder der diesem Wert entsprechenden Saugkraft ist nicht die Kenntnis des osmotischen Wertes bei Grenzplasmolyse (Og) sondern die im natürlichen Zustande erforderlich, das heißt jenes Zustandes, in dem sich die Zelle im Augenblick der Beobachtung befindet. Der Og entspricht nur dann dem On, wenn keine Volumenkontraktion erfolgt, In allen anderen Fällen ist eine Berücksichtigung der Volumenverminderung, welche die Zelle beim Uebergang vom natürlichen Zustand zum Grenzplasmolysezustand erfahren hat, erforderlich; namentlich wenn es sich, wie in unserem Falle, um den Vergleich dreier sich in Zellform und Dehnbarkeit unterscheidender Zelltypen handelt. Hierzu genügt die Kenntnis des Quotienten, der sich aus dem Volumen der Zelle im natürlichen Zustande und dem bei Grenzplasmolyse ergibt. Die Messung des ersteren ist direkt nicht möglich. Auch die von *Stalfelt* vorgeschlagene Fixierung durch Paraffinöl ist für unsere Objekte ungeeignet, da in diesem Medium Volumveränderungen, die durch Wasserverschiebung von Zelle zu Zelle bedingt sein können, erfolgen. Nun ist nach *Oppenheimer* (1932) eine Formel aufgestellt worden, welche die Errechnung des natürlichen Zustandes erlaubt. Grundlage hierfür sind die meßbaren Volumina bei Wassersättigung und Grenzplasmolyse. *Oppenheimer* nimmt an, daß das Volumen der Zelle im natürlichen Zustande dem Mittelwert beider ge-

messenen Werte entspricht, danach ergibt sich $Vn = \frac{Vs - Vg}{2}$ Die als Rechnungsgrundlage benutzten Volumenwerte stellen die Grenzpunkte der möglichen Schwankungen der Zellengröße dar. Demnach muß der Wert für das Volumen des natürlichen Zustandes zwischen beiden Werten liegen und um den Mittelwert schwanken. Die Größe dieser Schwankungen um den Mittelwert stellt den Fehler der Berechnungsweise dar. Eine direkte Messung des Fehlers ist aus demselben Grunde, wie die Messung des natürlichen Volumens nicht möglich. Mittels der genannten Formel werden nur Annäherungswerte erhalten, wie ja alle Volumenangaben wegen der komplizierten Zellform nur solche Annäherungswerte darstellen können und deshalb mit besonderer Vorsicht zu verwerten sind. Trotzdem darf aber diese Methode wegen der Berücksichtigung der Volumenkontraktion und möglichen Dehnbarkeitsunterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen gegenüber dem Vergleich der unkorrigierten Grenzplasmolysewerten als vorteilhaft gelten.

Für die Berechnung der Volumina wurden die Neben- und Epidermiszellen als Körper aufgefaßt, die sich aus je einem Zylinder und zwei Kugelkalotten, beide von gleicher Grundfläche, zusammensetzten, wobei für die unregelmäßig gelappte Zellfläche der planimetrisch gewonnene Wert als Größe einer Kreisfläche angesehen wurde.

Größere Schwierigkeiten ergaben sich bei der Volumenberechnung der Schließzellen. Da ein scharfes Erfassen des Querschnittes unverletzter Schließzellen nicht möglich war, wurden nach der von *Schwendener* angegebenen Weise die Höhen gleichfalls an Flächenschnitten gemessen. Nach dieser Berechnungsweise wurden die Werte der Tabelle 5 gewonnen. Auffallend ist die starke Dehnung der Nebenzellen, die die der Epidermiszellen um ein mehrfaches übersteigt. Diese Kontraktion kann durch ihre relativ dünne Zellmembran und ihr freies Hineinragen in die innere Atemhöhle bedingt sein. Die Werte für die Epidermiszellen sind verhältnismäßig niedrig und schwanken innerhalb enger Grenzen. Die Volumenberechnungen der Schließzellen, die an geschlossenen und an geöffneten, vom Druck der Nebenzellen befreiten Spalten durchgeführt wurden, lassen erhebliche Unterschiede erkennen. (Vergleiche hierzu die Volumenberechnungen bei *Schwendener, Ursprung* und *Blum* (1924), *Schellenberg.)*

Tabelle 5

Prozentuale Volumenkontraktionen der Schließ- Neben- und Epidermiszellen von Phuopsis stylosa

$$\frac{Vs - Vg}{2}$$

Schließzellen		Nebenzellen	Epidermis-zellen
geöffnet	geschlossen		
9,0	1,2	12,75	0,0
11,0	0,75	16,5	2,5
9,0	1,2	12,75	2,05
7,5	2,25	23,5	3,35
10,5	12,5	14,5	6,15
16,5	3,1	15,7	1,5
10,6	1,63	15,95	2,58

Unerläßlich bleibt für grenzplasmolytische Untersuchungen die Bestimmung des Zeitintervalles, in dem der Grenzplasmolysezustand konstant bleibt. Ein Vergleich der in Zeitabständen von fünf Minuten gezeichneten und planimetrierten Flächen der plasmolysierten Zellen ergab für Phuopsis, daß der Endzustand der Grenzplasmolyse in den Schließzellen nach 40 Minuten, in den Neben- und Epidermiszellen schon nach 30 Minuten erreicht war. Mit Endzustand ist derjenige Zustand gemeint, der bis zum Eintritt der Deplasmolyse unverändert andauert. Bei den Schließzellen blieb der Zustand mindestens 6 Stunden erhalten, bei den Neben- und Epidermiszellen trat frühestens nach 100 Minuten ein Rückgang der Plasmolyse ein. Bei Tradescantia pendula, dem Untersuchungsobjekt *Steinbergers,* blieb die erste sichtbare Abhebung des Protoplasten von der Zellwand in den Schließzellen 20 Minuten, in den Neben- und Epidermiszellen 10 Minuten nach dem Einlegen in das Plasmolytikum unverändert, die Deplasmolyse setzte in den Schließzellen nach 60 Minuten, in den Neben- und Epidermiszellen nach 40 Minuten ein. — Ein Nichtabwarten des Endzustandes hat *Steinberger* zu einem Trugschluß geführt. Sie fand ebenfalls bei Tradescantia pendula „daß die plasmolytische Grenzkonzentration nach 5 Minuten bei 0,60 G.M. Rohrzucker lag, bei Spalten, die vorher 5 Teilstriche weit geöffnet waren, nach 15 Minuten schon bei 0,20 G.M., nach 60 Minuten ebenso; nach 15 Minuten hatte entsprechend die Spaltweite in hypotonischen Lösungen auch schon

auf 1 Teilstrich abgenommen". Aus diesen Beobachtungen schloß sie, daß Zucker für diesen Zweck als Plasmolytikum ungeeignet sei. Nach meinen Erfahrungen wird der Endzustand in den Schließzellen von Tradescantia pendula nicht schon nach 5 Minuten, sondern erst nach 15 bzw. 20 Minuten erreicht und endet mit Eintritt der Deplasmolyse, frühestens 60 Minuten nach Versuchsbeginn; genau so lange blieb auch *Steinbergers* zweiter Wert konstant. Die Annahme liegt also nahe, daß die von *Steinberger* beobachteten Schwankungen lediglich durch Fortschreiten der Plasmolyse und nicht durch Eindringen des Zuckers in die Zelle bedingt sind, und daß der wahre Endzustand erst nach 15 Minuten erreicht war, die im ersten Versuch angewandte Konzentration also keine grenzplasmolytische war. Das Konstantbleiben des Plasmolysegrades während mindestens 45 Minuten — wie auch *Steinberger* angibt — zeigt die geringe Permeabilität des Protoplasten für Rohrzucker gegenüber KNO_3 und NaCl an und stellt damit den Rohrzucker als geeignetes Plasmolytikum hin.[5])

Der späte Eintritt der Deplasmolyse erlaubt ein genaueres Erfassen der Grenzplasmolyse jeder Zelle und ein Durchmustern einer größeren Zellzahl.

Die Größe eines weiteren Fehlers, der durch Viskositätsänderung des Protoplasmas und damit verbundener Aenderung der Adhäsion von äußerer Plasmahaut und Zellmembran bedingt ist, läßt sich nicht exakt fassen. Daß der Fehler wohl nicht erheblich ist, geht daraus hervor, daß sowohl bei geöffneten als auch bei geschlossenen Spalten von Phuopsis gleiche Konvexplasmolyse auftritt. Auch kann nicht die Verzögerung des Plasmolyseeintrittes in den Schließzellen geöffneter Stomata gegenüber denen geschlossener allein einer Zustandsänderung des Protoplasten und Erhöhung der Adhäsion der Plasmahaut zugeschrieben werden, (*Weber* 1925) jedenfalls muß man berücksichtigen, daß die stärker gedehnten Schließzellmembranen geöffneter Spalten mehr Zeit zur Entspannung erfordern als geschlossene, das heißt weniger gedehnte.

Versuchsbeschreibung.

Aus einer volumnormalen Stammlösung (Rohrzucker, puriss. Merck) wurde mittels Mikropipetten durch Verdünnung mit Aqua

[5]) Vgl. Ursprung u. Blum, 1924.

bidest. die notwendigen Lösungen in Abstufungen von 0,025 mol. hergestellt, kühl aufbewahrt und alle 2 — 3 Tage erneuert. Zur Untersuchung kamen Epidermisabzüge oder -schnitte von Blättern ein und desselben Quirles, die sich in ihrem Og bei der gewählten Abstufung durchweg gleich verhielten. Die Blätter von Quirlen verschiedener Sproßhöhe dagegen ließen ein Ansteigen des Og nach der Sproßspitze hin erkennen. In einem Falle lag bei Phuopsis der Ruhrzuckerwert eines 1 cm von der Spitze entfernten Blattquirles für die Epidermiszellen bei 0,4 mol., gegenüber den Blättern eines älteren 16 cm von der Sproßspitze entfernten Quirles bei 0,375 mol. Da für eine Versuchsreihe die 5 — 8 Blätter eines Quirles gewöhnlich nicht ausreichten, mußten die Blätter unmittelbar benachbarter Quirle mitbenutzt werden. Es wurde jeweils ein Epidermisschnitt in Alkohol fixiert und daran die Spaltweite gemessen, 4 — 5 oft halbierte Abzüge wurden in Schälchen gelegt, die die Plasmolytika enthielten und gegen Verdunstung durch einen Deckel mit eingeschliffenem Rande geschützt waren. Die Temperatur schwankte um 20° C.

Da nach den Blatträndern und der Blattspitze zu meist der Og ansteigt, wurden die beiderseits des Mittelnervs, ungefähr in der Blattmitte, gelegenen Zellen beobachtet. Zeigten innerhalb dieses Gewebekomplexes (Phuopsis) 40 Minuten nach Versuchsbeginn mindestens 50% der beobachteten Zellen Grenzplasmolyse, so galt die Konzentration des Plasmolytikums als Durchschnittswert (= Og). Daß vereinzelte Epidermiszellen beim Anschneiden und Loslösen vom Mesophyll geschädigt werden, ist unvermeidlich. Ein von den übrigen Epidermiszellen abweichendes Verhalten, Koagulation des Plasmas, Auflösung der Plastiden, sowie Ausbleiben der Plasmolyse waren Kennzeichen für Schädigung. Die Neben- und Schließzellen waren nur in seltenen Fällen beschädigt.

Zur mikroskopischen Beobachtung diente ein Wasserimmersionsobjektiv, Zeiß, Apochromat 2,5 mm., 70fache Eigenvergrößerung.

Um die eigenen Untersuchungen mit denjenigen anderer Autoren vergleichen zu können, werden teilweise die osmotischen Werte nicht in mol. Rohrzucker pro Liter Lösung, sondern die entsprechenden Atmosphärenwerte angegeben. Diese wurden einer Tabelle (Walter, Die Hydratur der Pflanze, 1931, S. 161) entnommen, die von Ursprung und seinen Mitarbeitern nach den empirisch von Morse, sowie Berkeley und Hartley ermittelten Werten durch Interpolation berechnet worden ist. Die Atmosphärenwerte für KNO_3-Lösungen sind in Ermangelung einer ausführlichen Tabelle einer Arbeit Renners (1912) teils direkt entlehnt, teils durch geradlinige Interpolation ermittelt.

Messungsergebnisse.

1. Phuopsis stylosa.

Die plasmolytischen Untersuchungen verschiedener Blätter desselben oder unmittelbar benachbarten Quirles ließen in Uebereinstimmung mit den Befunden *Ursprungs* und *Blums* und *Becks* bei der gewählten Abstufung von 0,025 mol. keine

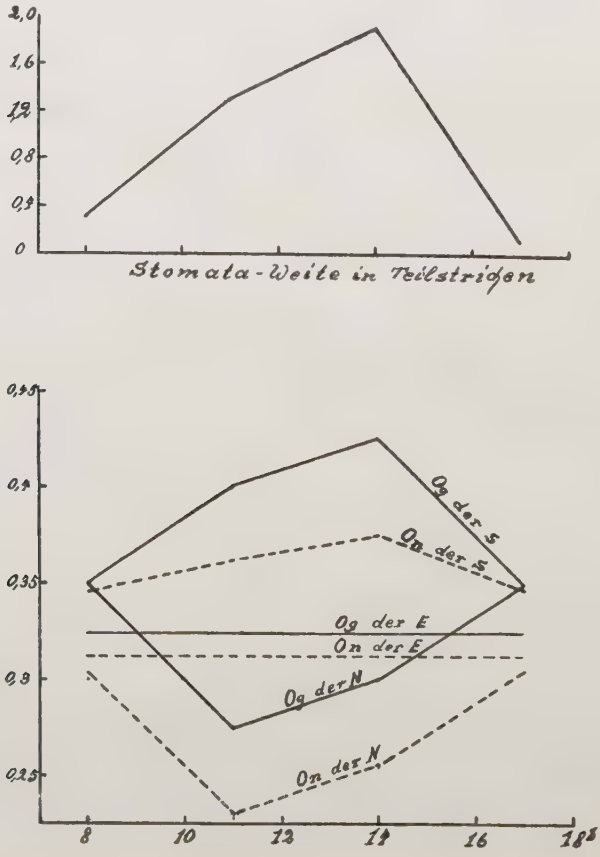
Tabelle 6.

Spaltapertur und Og (On) der Schließ-, Neben- und Epidermiszellen von Phuopsis stylosa.

	Stomata geöffnet. Og der			On der			Stomata geschlossen. Og der			On der		
Spaltweite	S.	N.	E.	S.	N.	E.	S.	N.	E.	S.	N.	E.
0,90	0,425	0,275	0,325	0,404	0,233	0,315	0,3	0,3	0,35	0,294	0,255	0,315
0.96	0,36	0,275	0,3	0,342	0,23	0,29	0,325	0,325	0,35	0,318	0,276	0,315
1,14	0,35	0,3	0,325	0,329	0,255	0,315	0,3	0,325	0,3	0,294	0,276	0,291
1,31	0,45	0,3	0,32	0,42	0,25	0,315	0,35	0,35	0,35	0,343	0,276	0,315
1,53	0,425	0,3	0,325	0,404	0,255	0,315	0,35	0,35	0,35	0,343	0,297	0,336
2,10	0,425	0,275	0,325	0,382	0,233	0,315	0,3	0,35	0,35	0,294	0,297	0,336

Figur 1.

Spaltöffnungsweite und Og (On) der Schließ- (S), Neben- (N) und Epidermiszellen (E) von Phuopsis stylosa.



meßbaren oder höchstens geringe tagesperiodische Schwankungen erkennen. Vergleiche Tab. 6 und Fig. 1. Im Höchstfalle stieg der osmotische Wert der Epidermiszellen bis zum Spätnachmittag um 0,05 mol. (ca. 1,45 Atm.) an. Unterschiede ergaben sowohl Messungen an verschiedenen Pflanzen, als auch Untersuchungen an derselben Pflanze zu verschiedener Jahreszeit. Gewächshauspflanzen zeichnen sich gegenüber Freilandpflanzen durch niedrigere osmotische Werte aus.

Die Ergebnisse der plasmolytischen Messungen sind für einige typische Beispiele in Tab. 6 und Fig. 1 dargestellt. Bei geschlossenen Spalten weisen die Schließzellen die niedrigsten Rohrzuckerwerte auf, mit der Oeffnungsbewegung steigen diese langsam an, erreichen mit dem Oeffnungsmaximum ihre größte Höhe und nähern sich mit der Schließbewegung ihrem Ausgangswert, der bei vollständigem Spaltenschluß meist erreicht wird. In dem in Fig. 1 dargestellten Versuch beträgt die Differenz der Grenzwerte 0,15 mol. (Sg = 3,96 Atm.). Bei Berücksichtigung der Volumenkontraktion, die bei größter Oeffnungsweite ca. 10%, bei geschlossenen Spalten rund 2% betragen soll, vermindert sich die Differenz der Grenzwerte auf 0,124 mol. (=3,26 Atm.) Die Amplitude ihrer Schwankungen ist außerordentlich gering und übersteigt niemals die von *Schwendener* angegebenen Werte. In keinem Falle ließen sich derartig hohe Saugkräfte finden, wie sie von *Steinberger, Iljin* (1925), und *Arends* (1926) angegeben werden. Doch sei hierzu auf den nächsten Abschnitt (S.=23) verwiesen.

Wie schalten sich die osmotischen Werte der Nebenzellen zwischen die fast unverändert bleibenden Werte der Epidermiszellen einerseits und die variablen der Schließzellen andererseits ein? Unter Berücksichtigung der Volumenkontraktion, die gegenüber dem natürlichen Zustande ca 15% beträgt, liegen sämtliche Rohrzuckerwerte der Nebenzellen unter denen der Schließ- und Epidermiszellen. Beim Ansteigen des osmotischen Wertes in den Schließzellen, also beim Oeffnen, fällt er in den Nebenzellen und umgekehrt, beim Sinken in den Schließzellen, also während der Schließbewegung, steigt er in den Nebenzellen. Die Variationsbreite der Og bzw. On ist in den Nebenzellen kleiner als in den Schließzellen. Die Nebenzellen verhalten sich den Schließzellen gegenüber antagonistisch, aber

nicht im Sinne *Struggers* und *Webers,* daß „der osmotische Wert bei Spaltenschluß in den Nebenzellen ganz beträchtlich über den der Schließzellen steigt und auch in den Epidermiszellen gesetzmäßigen Schwankungen unterworfen ist", sondern der osmotische Wert der Nebenzellen liegt unter normalen Bedingungen niemals über dem der Schließzellen. Gleichartige Verhältnisse fanden *Richter* und *Dworetzkaja* (Tab. 3) bei feinerer Abstufung ihres Plasmolytikums. Jedoch wurde diesem einzigen Befund keine Bedeutung beigemessen und blieb daher in ihrer Zusammenfassung unberücksichtigt. (Vgl. hierzu *Sayre* (1926).

Eine besondere Betrachtung erfordern einige seltene Fälle, in denen der Og der Nebenzellen scheinbar über dem der Schließzellen lag, und zwar übertraf am langsam welkenden Blatt der Og der Nebenzellen den der Schließzellen um 0,025 mol. Berechnet man jetzt die On, so fällt ihr Wert mit dem der Schließzellen zusammen oder liegt unter ihm. (Vergl. Tab. 6.)

2. Galium mollugo.

Nur ganz beiläufig wurden auch an der Blattunterseite von Galium mollugo Og für die drei Zelltypen festgestellt. Auch hier scheinen die für Phuopsis geltenden Regelmäßigkeiten Gültigkeit zu haben.

3. Tradescantia pendula.

Aus zweifachen Gründen wurden weitere Untersuchungen an Tradescantia pendula ausgeführt, einmal weil dieses Objekt gegenüber den beiden Rubiaceen chlorophyllfreie Epidermis- und Nebenzellen besitzt und deshalb hier besonders klare Verhältnisse im Sinne *Struggers* und *Webers* erwartet werden mußten. Sodann machen die in der Literatur vorhandenen und vielfach diskutierten Angaben über abweichende, in ihrer Höhe bisher unerklärlich gebliebene osmotische Werte eine Nachprüfung durch neue Versuche mit Rohrzucker wünschenswert. In Tabelle 7 ist der Befund eines aus einer Reihe mit gleichem Ergebnis verlaufenden Versuchen ausgewählten Beispiels wiedergegeben. Der Verlauf und die Höhe des Og der Epidermiszellen entsprach in allen Versuchsreihen den von *Knudson* und *Ginsburg* (1921) plasmolytisch ermittelten; er lag unverändert während des ganzen Tages bei 0,15 mol. Rohr-

zucker, was einer Saugkraft der Zelle bei Grenzplasmolyse von 4 Atm. gleichkommt. *Wiggans* (1921), der sämtliche Plasmolyseversuche mit $CaCl_2$ durchgeführt hat, fand im Laufe des Tages für Tradescantia pend. einen konstant bleibenden Grenzplasmolysewert von 0,09 mol., der einer Saugkraft von ca. 5,25 Atm. entspricht. (Die Umrechnung erfolgte nach einer von *Wiggans* aufgestellten Tabelle S. 31). Die Differenz zwischen den Epidermiswerten *Wiggans'* und den unsrigen, die etwa 1,25 Atm. beträgt, könnte ihren Grund sowohl in der Verschiedenheit der benutzten Plasmolytika, als auch in konstitutionellen Unterschieden der Objekte haben.

Tabelle 7.

Zeit	8h	11h	14h	17h	20h
Spaltweite	0,5	0,9	3 1	1,0	0,0
Og der S	0,25 mol.	0.25 mol.	0,35 mol.	0.25 mol.	0,15 mol.
Og der N	0,15 mol.	0.15 mol.	0,15 mol	0,15 mol.	0 15 mol.
Og der E	0,15 mol.	0,15 mol.	0,15 mol.	0,15 mol.	0,15 mol.

Die osmotischen Werte der Schließzellen liegen niemals unter denen der Epidermis- und Nebenzellen, zeigen aber im Unterschied von diesen Schwankungen von 0,15 — 0,35 mol. Rohrzucker, oder in Sg Werten ausgedrückt 2,6 — 9,6 Atm. (Vergl. neben Tab. 7 auch Fig. 2). Der Maximaldifferenz von 7 Atm. entspricht die von *Wiggans* mittels $CaCl_2$-Lösung gefundene von 5,97 Atm.

Die Nebenzellen zeigen die gleichen, während des ganzen Tagesverlaufes unverändert bleibenden osmotischen Werte wie die Epidermiszellen. Es wären allerdings Abweichungen der On von den Og möglich, da bei diesem Objekt etwaige Volumenkontraktionen nicht berücksichtigt werden konnten, weil die Zellwände der Epidermiszellen bei der Plasmolyse knitterten, und deshalb exakte Volummessungen unmöglich waren.

IV. KNO_3-Permeabilität der Schließ-, Neben- und Epidermiszellen von Tradescantia pendula.

Den von *Wiggans* mit $CaCl_2$-Lösungen ermittelten Werten, wie auch unseren Rohrzuckerwerten stehen Angaben anderer Autoren gegenüber, die teils im Rahmen dieser Werte liegen,

teils ihn beträchlich überschreiten. Außerordentlich hohe Sg fand *Iljin* (1915) an Steppenpflanzen, die naturgemäß unter äußerst ungünstigen Wasserverhältnissen leben. Gleich hohe Werte fand *Steinberger* für Pflanzen unserer Breiten. So gibt sie für Tradescantia pendula für die Schließzellen geöffneter Stomata als Höchstwerte Og = 1,5 mol. KNO_3 (Sg =53 Atm.) in einem Falle sogar 2,0 mol. NaCl (Sg=90 Atm.) *Arends* erhielt am gleichen Objekt in stärkefreien Schließzellen Werte bis 1,3 mol. NaCl (Sg=59 Atm.).

Für diese Unterschiede allein die Stomataweite verantwortlich zu machen, ist nicht angängig, da auch Messungen an maximal weit geöffneten Spalten Werte ergaben, die erheblich unter den eben angeführten liegen. Gegen die Vermutung *Steinbergers,* daß die niedrigen von *Wiggans* gefundenen Sg ihre Ursache in einer geringen Wasserzufuhr der benutzten Objekte hätten, sprechen unsere Versuche, die an Pflanzen der gleichen Art bei reichlichster Wasserversorgung ganz ähnliche Zahlen ergaben. Näher liegt es mit *Ursprung* und *Blum* (1924) die Ursache für solch erhebliche Unterschiede in der Natur der verschiedenartigen Plasmolytika zu suchen. Da die Zellsaftkonzentration eines Blattes in der Spreitenmitte beiderseits des Hauptnerven fast gleich ist, war es erlaubt, mit verschiedenen Plasmolytika vergleichende osmotische Messungen am gleichen Blatt durchzuführen; es wurden die Og der einen Epidermishälfte in KNO_3, die der anderen in Rohrzucker bestimmt und die daraus errechneten Sg-Werte verglichen. Das Ergebnis solcher Versuche ist in einem hierfür typischen Beispiel in Fig. 2 wiedergegeben. Wie oben gezeigt wurde, ist man berechtigt, die Rohrzuckerwerte als die wahren anzusehen und sie deshalb beim Vergleich als Standartwerte zu benutzen. Da in allen Versuchen mit KNO_3 ein rascher Eintritt der Deplasmolyse festgestellt wurde, mußte die Beobachtung kurz (5—10 Minuten) nach Versuchsbeginn erfolgen. Der rasche Rückgang der Plasmolyse deutet darauf hin, daß KNO_3 schon bald permeiert oder Anatose auslöst.

In den Neben- und Epidermiszellen ergeben sich mit KNO_3-Lösungen die gleichen Sg-Werte wie mit Rohrzucker. Die KNO_3-Kurve fällt in ihrer Höhe wie in ihrem Verlauf mit der des Rohrzuckers zusammen und stellt eine Gerade dar. Demnach haben die Protoplasten beider Zelltypen während der

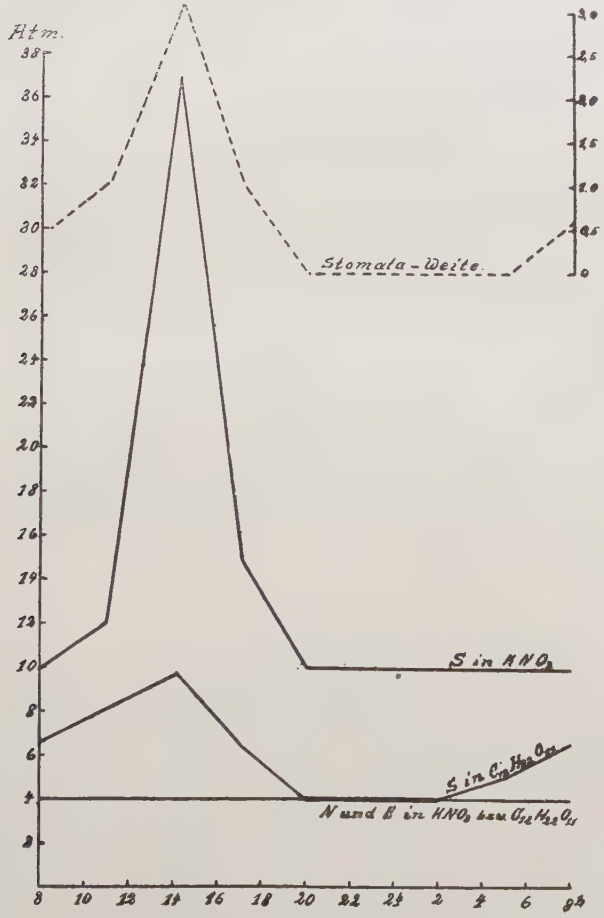
Versuchsdauer keine merkbaren Mengen des Salzes durchgelassen.

Für die Schließzellen liegen die aus den KNO_3-Konzentrationen errechneten Atmosphärenwerte immer über denjenigen der Rohrzuckerwerte, die zwischen 4 und 9,6 Atm.

Figur 2

Spaltöffnungsweite und Og der Schließ- Neben- und Epidermiszellen für KNO_3 und Rohrzucker.

Tradescantia pendula



schwanken, gegenüber einer Amplitude der KNO_3-Werte von 27 Atm. (10—37 Atm.) Hieraus geht hervor, daß bis zum Beobachtungszeitpunkt schon KNO_3 in die Zelle eingedrungen

sein muß. – Folgt im allgemeinen die KNO_3-Kurve derjenigen der Rohrzuckerwerte, so ergeben sich doch beachtenswerte Abweichungen. Das Maximum der Kurve fällt wie das der Rohrzukkerwerte mit dem der Spaltöffnungsweite zusammen. Ebenso werden mit KNO_3 die niedrigsten Og bei gleichzeitiger, geringster Spaltenapertur gemessen. Während in dem der graphischen Darstellung zu Grunde liegenden Versuche die mit Rohrzucker gemessenen osmotischen Werte trotz zunehmender Spaltenöffnung zunächst noch konstant bleiben, zeigt die Kurve der KNO_3-Werte einen sofortigen Anstieg. Eine weitere Abweichung ist im späteren Kurventeil erkennbar: mit dem abendlichen Schluß der Spalten sinken die Rohrzuckerwerte unter ihre Anfangsgröße (Wert um 8 Uhr) und bleiben bis zum Beginn des Oeffnens (2 Uhr— 3 Uhr) auf dieser Höhe stehen, um gegen 8 Uhr den Ausgangswert wieder zu erreichen. Anders verhalten sich die Salpeterwerte, auch diese sinken während der Schließbewegung, jedoch nur bis zum Ausgangswert, der unverändert bis zum andern Morgen beibehalten wird. Also folgt die Rohrzuckerkurve mit größerer Treue als die KNO_3-Kurve der Spaltenbewegung. (Vgl. Kurventeil von 20 Uhr—5 Uhr). Die in Erscheinung tretenden Abweichungen zwischen der Kurve der Zuckerwerte und der Spaltweite erklären sich zwanglos, da es verständlich erscheint, daß eine Erhöhung der osmotischen Werte in den Schließzellen früher bemerkbar wird, als die hierdurch bewirkte Zunahme der Spaltenweite und ebenso, daß nach Beendigung des Ansteigens der Og die Oeffnungsbewegung noch fortdauert.

Tabelle 8

Prozentuale Schwankungen der Rohrzucker-, KNO_3-Werte und Spaltweite.

Zeit	$C_{12}H_{22}O_{11}$	KNO_3	Stomataweite
8h	100	100	100
11h	100	170	200
14h	153	370	600
17h	100	130	900
20h	61	100	200
23h	61	100	200
2h	61	100	200
5h	76	100	0
8h	100	100	120

Zur Aufstellung der Tab. wird jeweils der um 8 Uhr gemessene Wert = 100 gesetzt.

Es liegen also nicht nur die KNO_3-Werte absolut über den Zuckerwerten, sondern zeigen auch erheblich voneinander abweichende prozentuale Schwankungen im Tagesverlauf (vergl. Tab. 8), was sich in der graphischen Darstellung (Fig. 2) in ungleichen Abständen zeigen muß. Diese Abstände, d. h. die Differenzen zwischen den Rohrzuckerwerten und den KNO_3-Werten sind Ausdruck für die KNO_3-Permeabilität. Die Differenz ist beim Maximum der übrigen Kurven am größten und verkleinert sich bei fortschreitender Schließung.

Es besteht also eine Beziehung zwischen Spaltenweite und KNO_3-Permeabilität; jedoch ist diese keine feste, da die Minima beider Werte nicht zusammenfallen. Daraus kann geschlossen werden, daß zwischen diesen Größen keine direkte Kausalbeziehung besteht, daß für die Veränderung der einen, die Veränderung der anderen nicht die alleinige Ursache darstellt, daß beiderlei Schwankungen zum Teil durch gleiche, zum Teil durch verschiedene Faktoren verursacht sein müssen.

Die außerordentlich hohen osmotischen Werte, die mit KNO_3 gefunden werden, haben also ihre Ursache in der erhöhten KNO_3-Permeabilität der Schließzellen geöffneter Spalten. Jedoch soll hiermit nichts über das Verhalten der osmotischen Werte von Steppenpflanzen gesagt sein. — Neuerdings versucht *Iljin* (1933), die früher von ihm gemachten Angaben experimentell zu bestätigen. Doch dürfte eine Uebertragung dieser unter anormalen Bedingungen gewonnenen Werte auf die Verhältnisse der freien Natur nicht ganz unbedenklich erscheinen.

V. Besprechung.

Die Bewegungen des Spaltöffnungsapparates haben nach den bisherigen Untersuchungen *(Schwendener, Schellenberg, Ursprung* und *Blum* (1924) wie auch nach eigenen Erfahrungen (S. 15) ihre Ursache in Volumveränderungen der Schließzellen. Eine aktive Beteiligung anderer Zellen an der Spaltenbewegung muß einmal an der Aenderung ihrer osmotischen Zustandsgrößen und deren Beziehungen zur Spaltapertur und den osmotischen Werten der Schließzellen sichtbar werden. Hiernach scheiden für unser Objekt die Epidermiszellen von vornherein aus, da ihre nahezu konstanten osmotischen Werte

keinerlei Beziehungen zur Spaltweite erkennen lassen. Ihre für das Spiel der Spalten bewiesene Funktionslosigkeit erweist sich noch auf einem anderen Wege: Ein Anstechen der Epidermiszellen mittels des Mikromanipulators, wie es in einigen Fällen durchgeführt wurde, bleibt ohne jeden nennenswerten Einfluß auf die Spaltweite.

Nach dem Verhalten der Nebenzellen lassen sich unter den benutzten Objekten zwei Typen unterscheiden, von denen der eine durch Tradescantia pendula, der andere durch Phuopsis stylosa repräsentiert wird.

Die oben ausgeführten Versuche brachten als Ergebnis, daß bei Phuopsis mit zunehmender Spaltenweite das osmotische Gefälle in Richtung Schließzellen ⟶ Nebenzellen zunimmt, mit abnehmender Weite sich umkehrt und bei geschlossener Spalte gleich null wird. Diese Veränderung erfolgt gleichzeitig von Seiten beider für das Gefälle verantwortlichen Komponenten, den Schließ- und Nebenzellen: Steigt beim Oeffnen die Zellsaftkonzentration in den Schließzellen, so fällt sie in den Nebenzellen; bei der Schließbewegung zeigt sich ein entgegengesetztes Verhalten. Das osmotische Gefälle, das den einzelnen Oeffnungsstadien entspricht, ist derart gerichtet, daß der zur jeweilig erforderlichen Volumänderung notwendige Wasseraustausch der Schließzellen begünstigt erscheint. Die zur Oeffnungsbewegung erforderliche Volumvergrößerung der Schließzellen muß durch Wassereinsaugung aus den Nebenzellen erfolgen. Eine solche Saugung ist durch die niedrige Zellsaftkonzentration der Nebenzellen erleichtert. Da nun bei der Oeffnungsbewegung die On der Nebenzellen unter denen der Epidermiszellen liegen, eine Wassersaugung in die Nebenzellen von Seiten der Epidermis her also ausgeschlossen ist, müßte eine Erhöhung der Zellsaftkonzentration und damit ein :Steigen des osmotischen Wertes in den Nebenzellen die Folge sein. Das erfolgt aber nicht, vielmehr vergrößert sich bei anhaltender Oeffnungsbewegung das Gefälle und sinkt in den Nebenzellen die Zellsaftkonzentration. Dafür gibt es nur eine Erklärung, daß nämlich die Menge der osmotischen Substanzen verringert wird, entweder durch Umwandlung in unwirksame, durch Ableitung oder Veratmung. Für die erste Möglichkeit spricht die Beobachtung der Stärkezunahme in den Nebenzellen.

Dieser Annahme scheint aber das Ergebnis des in Abb. 2 (S. 10) wiedergegebenen Versuches entgegenzustehen. In diesem einen Falle geht die Oeffnungsbewegung vor sich, ohne daß in den Nebenzellen Stärke sichtbar wird, diese erscheint erst bei beginnendem Schließen und nimmt während des Vorganges weiter zu. Zur Aufhellung des scheinbaren Widerspruchs ist zu beachten, daß beide Vorgänge, Veränderungen des Stärkegehaltes und Schwankungen des osmotischen Wertes nicht in strengem Kausalzusammenhang stehen. Ein Sinken der osmotischen Werte kann ohne gleichzeitige Stärkeanreicherung stattfinden, solange bei niedrigem Gehalt an osmotischen Substanzen die Zellsaftkonzentration in Neben- und Epidermiszellen übereinstimmt, daß also eine Wasseraufnahme der Nebenzellen aus den Epidermiszellen erfolgen kann, oder dann, wenn osmotische Substanzen aus den Nebenzellen abgeleitet werden. Beide Voraussetzungen sind am ehesten am frühen Vormittag erfüllt.

In der Regel ist aber, wie die Veränderung des Stärkegehaltes der Nebenzellen zeigt, das Sinken des osmotischen Wertes in diesen Zellen an die Abnahme der osmotisch wirksamen Substanz gebunden, das Steigen an eine Zunahme. Dem steht scheinbar eine weitere Erfahrung gegenüber: In den Nebenzellen von Phuopsis steigt während der Schließbewegung der Stomata und während des Steigens der Zellsaftkonzentration in den Nebenzellen die Stärkemenge weiter an. Diesen Widerspruch vermag aber die durch die Anwesenheit von Chloroplasten bewiesene assimilatorische Funktion der Zellen zu beheben. Es kann ja die Neubildung von Assimilaten so groß sein, daß die beim Steigen notwendige Zunahme der osmotischen Substanz durch Assimilation nicht nur gedeckt, sondern soweit übertroffen wird, daß die Stärke-Zuckerschwelle, das heißt, die für die Zelle unter gegebenen Verhältnissen maximale Zuckerkonzentration überschritten und damit bei fehlender Ableitung eine weitere Ablagerung osmotisch unwirksamer Substanz erforderlich wird.

Hieraus ergäbe sich zunächst folgende Bedeutung der Nebenzellen für den Spaltöffnungsapparat von Phuopsis stylosa: Sie bilden das Wasserreservoir der Schließzellen. Durch eine zweckmäßige Regulierung der Zellsaftkonzentration wird das osmotische Gefälle Schließzellen◁—▷ Nebenzellen im

Sinne der jeweiligen Bewegung gerichtet. Für Phuopsis ist demnach der Annahme *Struggers* und *Webers* beizupflichten, daß die Nebenzellen funktionell dem Spaltöffnungsapparat zuzurechnen sind und ihre Beteiligung in der Veränderung der osmotischen Zustandsgrößen zu suchen ist. Nicht aber kann die für Galium mollugo entwickelte Ansicht beider Autoren für unser Objekt gelten, daß das Spiel der osmotischen Werte zwischen Schließ- und Nebenzellen die Ursache der Spaltöffnungsbewegung darstellt, denn das hierzu erforderliche und auch von *Strugger* und *Weber* behauptete Ueberschneiden der osmotischen Kurven der Schließ- und Nebenzellen konnte nie beobachtet werden; höchstens kamen die Nebenzellen in ihren osmotischen Werten den Schließzellen gleich. Daraus ergibt sich, daß die Beteiligung der Nebenzellen am Bewegungsvorgang nur eine akzessorische ist, das heißt, daß sie den an sich autonomen Vorgang unterstützt.

Von Interesse ist hier die Beobachtung, daß die KNO_3-Permeabilität derart in Zusammenhang mit dem Spaltöffnungszustand steht, daß die Permeabilität im Stadium des Oeffnungsmaximums am größten ist. Die Frage, ob für die Wasserpermeabilität dieselben Beziehungen bestehen, konnte nicht entschieden werden. Wäre dies der Fall, so wäre die Permeabilitätssteigerung ein weiteres Mittel, die Deckung und Aufnahme des Wasserbedarfes der Schließzellen zu erleichtern.

Eine weitere Bedeutung der Nebenzellen ergibt sich schon aus ihrer anatomischen Anordnung: Die Volumveränderung der Schließzellen — die primäre Ursache der Spaltenbewegung — muß auf irgend eine Weise durch die Nebenzellen beeinflußt sein. Daß ein solcher Einfluß wirklich besteht, zeigten Versuche, in welchen die Schließzellen von dem Druck der Nebenzellen durch Anstechen der lezteren befreit worden waren. Das Ergebnis, daß nach dem Anstechen die Oeffnungsweite sowohl geöffneter als auch geschlossener Spalten (ausgenommen Spalten maximaler Oeffnungsweite) noch zunimmt, beweist, daß der von den Nebenzellen ausgeübte Druck einen Widerstand dem Oeffnen entgegensetzt. Die Größe des Druckes ist naturgemäß von der Turgeszenz der Nebenzellen, die ihrerseits wieder vom osmotischen Wert bedingt wird, abhängig. Daß die Veränderungen des von den Nebenzellen auf die Schließzellen ausgeübten Druckes nicht die hauptsächlichsten

Ursachen der Spaltenbewegung darstellen können, ergibt sich gleichfalls aus dem Ergebnis der genannten Versuche, da durch Anstechen der Nebenzellen geschlossener Spalten niemals maximale Oeffnung erreicht wurde.

Zur Beurteilung der Bedeutung der Nebenzellen von Phuopsis stylosa ist schließlich in diesem Zusammenhang die hohe Dehnbarkeit der Nebenzellwände (15%) zu erwähnen. Sie ermöglicht es, daß Veränderungen der osmotischen Zustandsgrößen sich in weitem Maße in Volumveränderungen äußern, auf deren Bedeutung für die Spaltbewegung soeben hingewiesen worden ist.

Andere Verhältnisse liegen bei Tradescantia pendula vor. Im Gegensatz zu Phuopsis bleiben die osmotischen Werte der Nebenzellen, unabhängig von den Bewegungsvorgängen der Spalten, unverändert. Für dieses abweichende Verhalten gibt der anatomische Vergleich einen Hinweis. Bei Tradescantia sind im Vergleich zu Phuopsis die Nebenzellen frei von Chloroplasten. Durch den damit verbundenen Ausfall der Assimilation fehlt ein wichtiger Faktor, der ändernd auf die osmotischen Zustandsgrößen einwirken kann. Demnach sind Veränderungen des osmotischen Wertes der Nebenzellen durch Veränderungen des Wassergehaltes oder über den weiteren Weg der Ab- oder Zuleitung osmotischer Substanz möglich. Der erstgenannte Fall wird vor allem dann eintreten, wenn während der Oeffnungsbewegung die Og in den Schließzellen steigen und damit eine Wasserabgabe der Nebenzellen an die Schließzellen erfolgt. Da aber die Epidermiszellen und Nebenzellen — falls keine ungleiche Volumenkontraktion anzunehmen ist — in ihren osmotischen Werten übereinstimmen, ist es leicht vorstellbar, daß alle zeitweilig auftretenden Aenderungen der Zellsaftkonzentration sofort von der hier als Wassergewebe funktionierenden Epidermis ausgeglichen werden. Die Konstanz der osmotischen Werte kann daher nicht als verwunderlich erscheinen. Den Nebenzellen kommt demnach bei Tradescantia gegenüber denen bei Phuopsis keine entsprechende funktionelle Bedeutung zu.

Nach vorliegenden Untersuchungen ist die von *Strugger* und *Weber* aufgestellte Behauptung von dem osmotischen Antagonismus zwischen Neben- und Schließzellen als kausalem

Prinzip der Spaltöffnungsbewegung für Tradescantia nicht, für Phuopsis nur bedingt zutreffend; andererseits entspricht auch die Annahme *Richters* und *Dworetzkajas* von einer völligen Beziehungslosigkeit der Nebenzellen für die Stomata nicht den experimentell ermittelten Tatsachen.

VI. Histochemie des Spaltöffnungsapparates.

Von *Ziegenspeck* (1925) ist für das Polstergelenk von Mimosa Spegazzini, von *Overbeck* (1926) für das Widerstandsgewebe der Spritzgurkenfrucht und von *Kasselmann* (1933) für die gelenkartigen Teile der Internodien von Phuopsis gefunden worden, daß Membranen solcher Gewebe, die Reizbewegungen ausführen, durch eine ihnen eigene histochemische Beschaffenheit ausgezeichnet sind. Auch für die Zellwände des Spaltöffnungsapparates ließen sich — namentlich in Hinsicht auf die überaus stark dehnbaren Membranen der Nebenzellen (15%) von Phuopsis — ähnliche Verhältnisse annehmen. Schon im Wasserpräparat treten ihre Wände durch einen perlmutterartigen Glanz besonders in die Erscheinung und weisen auf Zellwände hin, wie sie in den Kollenchymen („Kollose") vorliegen. Genauerer Aufschluß hierüber sollte. 1. aus ihrem Verhalten gegenüber Jodreagenzien, 2. aus der verschiedenen Absorptionsfähigkeit für substantive Farbstoffe und 3. aus der Löslichkeit der Membranen durch Einwirken von Enzymen (Cytase) gewonnen werden.

Als Grundlage für diese Untersuchungen dienten die Arbeiten von *Frank Schwarz* (1924), *M. Märkert* (1931) und *J. Kasselmann.*

1. Verhalten gegenüber Jodlösungen.

Besonders geeignet für orientierende Untersuchungen erwiesen sich die Zellwände des Spaltöffnungsapparates von Amaryllis. In *Wisselinghs* Amyloidreagens[6]), das von den angewandten Reagenzien die geringste Jodmenge enthält, blieben die Zellwände ungefärbt. Auch bei den übrigen untersuchten Objekten fiel die Reaktion negativ aus. Behandelt

[6]) Betreffs der Zusammensetzung der angewandten Reagenzien sei auf die Arbeit von Kasselmann (S. 8) verwiesen.

man aber die Querschnitte ca. ¼ Stunde mit Eau de Javelle (19 Bé.), wässert sie darauf gründlich und überträgt sie in Jodlösung nach *Arthur Meyer,* so tritt eine recht deutliche Blaufärbung in den Membranen des Spaltöffnungsapparates auf. Bei starker Vergrößerung erscheint die Epidermis schwach blau, die Verdickungsleisten der Schließzellen nehmen ein dunkleres Blau an, das jedoch nach den „Hörnchen" zu deutlich verblaßt. Die Membran zwischen Schließ- und Epidermiszellen läßt einen intermediären Farbton erkennen, der dunkler gefärbt ist als der der Epidermiszellen, aber heller als der der Schließzellen. *Ziegenspecks* Kollose Reagens, das bei gleicher Jodmenge 25% HCl enthält, gibt schwächere Färbungen, die eine Farbnuancierung in den Verdickungsleisten nicht mehr erkennen lassen. Chlorzinkjod färbt alle Membranen violett.

Die Membranen des Spaltöffnungsapparates bestehen also aus jener Zellwandmodifikation, die in der Literatur als Kollose bezeichnet wird. Mit *Kasselmann* verstehe ich darunter alle diejenigen Kohlehydratlamellen, die sich nach vorhergehender Behandlung mit Eau de Javelle, sowie bei gleichzeitigem Säurezusatz in Jodlösungen bestimmter Konzentration deutlich bläuen. Auch für die Wände des Spaltöffnungsapparates von Phuopsis und Tradescantia ließ sich eine gleiche kollodische Beschaffenheit nachweisen, in jedem Falle färbten sich die Verdickungsleisten intensiver als alle übrigen Zellwände. Letzteres läßt auf eine Modifikation der Kollose schließen, die dem Amyloid näher steht.

2. Verhalten gegenüber substantiven Farbstoffen.

Die bekannte Tatsache, daß sich Farbe und Färbungsintensität nach der Größe der Farbstoffteilchen richtet, läßt einen Rückschluß auf die Dichte der Zellwände zu. Um möglichst deutliche Farbdifferenzen zwischen Zellin- und Ligninwänden zu erhalten, wurde das von *Schwarz* empfohlene Brillantkongoblau 2 R W verwandt, das je nach der Membrandichte verschieden gefärbt erscheint (blau ⟶ violett ⟶ purpur ⟶ rot ⟶ orange ⟶ gelb).

In einer 0,01% wässerigen Methylenblaulösung nimmt die Kutikula, die die Schließzellen von Amaryllis bis zur An-

satzstelle des Mesophylls umfaßt, einen gelben bis gelbbraunen Farbton an, während die Epidermis schwach blau — nach den Zellumen zu jedoch dunkler gefärbt — erscheint. Ebenso wie in Jodlösungen erscheinen auch hier die Membranen der Schließzellen gegenüber denen der Epidermiszellen intensiver blau gefärbt. Gleichfalls läßt sich eine deutliche Abnahme des Färbungsgrades nach der inneren und äußeren Atemhöhle zu erkennen. Hieraus ergibt sich, daß die Schließzellwände, namentlich die dem Zellumen zugewandten Teile der Verdickungsleisten ein lockereres Gefüge besitzen als die Epidermiswände.

Tradescantia und Phuopsis verhielten sich in Brillantkongoblau entsprechend, mit der Einschränkung, daß die Farbtöne schwächer waren. Die Nebenzellen traten nicht besonders in Erscheinung.

In 0,01% wässeriger Methylenblaulösung jedoch färben sich die Epidermiszellwände und die „Hörnchen" dunkelblau, die Verdickungsleisten heller. Ueberträgt man solche Schnitte in Glycerin, so bleibt die Färbung (blaugrün) am längsten in den „Hörnchen" erhalten, während mit Außnahme der Gefäßwandungen, alles andere Gewebe, auch die übrige Kutikula sich vollkommen entfärbt hat.

3. Löslichkeit der Zellwände in Schneckencytase.

Im Anschluß an die Arbeit von *Haberlandt* (1918) wurden Versuche über die Verdaulichkeit von Membranen durch Cytase angestellt. Sowohl Handschnitte als auch Mikrotomschnitte (15 μ) von Phuopsis wurden im Lebersekret von Schnecken (Helix pomatia) beobachtet. In den meisten Fällen konnte schon nach ca. 2 Stunden ein Verschwinden der Verdickungsleisten und Zwischenmembran festgestellt werden, während die übrigen Zellwände kaum angegriffen waren. Auch gegenüber Cytase verhalten sich die Wände der Nebenzellen nicht anders, als die der Epidermiszellen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Verdickungsleisten der Schließzellen, die einen stärker amyloidischen Charakter tragen als die übrigen Kollosewände und das lockerste Zellgefüge besitzen, in Schneckencytase am leichtesten angegriffen werden.

Zusammenfassung.

1. Die Messung von Spaltweiten an Schnitten, die außer der Epidermis noch 2–3 Schichten Mesophyll besitzen und dann in absolutem Alkohol fixiert werden, liefert brauchbare Werte.

2. Eine quantitative Bestimmung des Zuckergehaltes der Schließ- Neben- und Epidermiszellen ist mir mit den geprüften Methoden nicht möglich gewesen.

3. Bei Phuopsis stylosa nimmt in der Regel während der Oeffnungsbewegung der Stomata der Stärkegehalt in den Schließzellen ab, in den Nebenzellen zu; während der Schließbewegung steigt in beiden Zelltypen die Stärkemenge an, so daß bei vollkommenem Spaltenschluß sowohl für die Schließzellen, als auch für die Nebenzellen das Maximum des Stärkegehaltes erreicht ist.

4. In CO_2-freiem Raume sind bei maximal geöffneter Spaltweite Schließ- und Nebenzellen stärkefrei.

5. Bei Phuopsis steigt mit der Oeffnungsbewegung der On in den Schließzellen an und fällt gleichzeitig in den Nebenzellen. Umgekehrt nimmt während des Schließens der osmotische Wert in den Schließzellen ab, in den Nebenzellen zu, ohne den Wert der Schließzellen zu übersteigen. In den Epidermiszellen verändert sich der Wert kaum.

6. Bei Tradescantia pendula folgt der osmotische Wert in den Schließzellen der Spaltenbewegung, in den Nebenzellen ist er dem der Epidermiszellen gleich und bleibt unverändert.

7. Die KNO_3-Permeabilität bei Tradescantia ist je nach der Spaltweite verschieden, maximal bei größter Spaltenapertur. Das Verhältnis der Rohrzuckerwerte zu den Salpeterwerten, der Permeabilitätskoeffizent, ist ein Maß für die KNO_3-Permeabilität.

Hinsichtlich der Bedeutung der Nebenzellen für den Spaltöffnungsapparat sind unter den untersuchten Objekten zwei Typen zu unterscheiden: für Phuopsis besteht zwischen Schließ- und Nebenzellen ein funktioneller Zusammenhang derart, daß die in den Nebenzellen vor sich gehenden Veränderungen das Zustandekommen der Spaltbewegung erleichtern. Im zweiten Typ (Tradescantia) sind die Nebenzellen funktionell dem Spaltöffnungsapparat nicht zuzurechnen.

9. Ein Antagonismus im Sinne *Struggers* und *Webers* wurde weder bei Phuopsis stylosa, noch bei Tradescantia pendula festgestellt. Ebensowenig trifft die Annahme *Richters* und *Dworetzkajas,* daß zwischen Schließ- und Nebenzellen keinerlei „chemische und osmotische" Beziehungen beständen, nur für bestimmte Objekte, nicht allgemein zu.

10. Ein histochemischer Unterschied zwischen den stark dehnbaren Zellwänden der Nebenzellen gegenüber denen der Epidermiszellen ließ sich nicht nachweisen. Ihre Membranen sind wie die der Schieß- und Nebenzellen kollodisch.

Die intensive Färbung der Verdickungsleisten der Schließzellen mittels substantiver Farbstoffe, sowie ihre leichtere Löslichkeit in Cytase weist auf ein lockeres Gefüge hin, woraus vielleicht auf eine erhöhte Quellbarkeit geschlossen werden kann.

Diese Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Münster ausgeführt und von der Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät als Dissertation angenommen. Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Benecke, möchte ich für das große Interesse und die vielseitige Unterstützung, die er mir zuteil werden ließ, meinen aufrichtigsten Dank aussprechen .

Lebenslauf.

Am 23. Dezember 1904 wurde ich als Sohn des Hotelbesitzers *Fritz Kelle* zu Bad Oeynhausen geboren. Nach Verlassen der Volksschule bestand ich 1925 das Lehrerexamen und erwarb 1927 das Reifezeugnis eines Realgymnasiums. Ich widmete mich sodann an den Universitäten Berlin und Münster (Westf.) dem Studium der Naturwissenschaften, namentlich der Botanik.

Seit dem 1. April 1933 habe ich am Botanischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität die Stelle eines außerplanmäßigen Assistenten inne.